



(10) 申请公布号 CN 119654417 A

(43) 申请公布日 2025.03.18

(21) 申请号 202380057844.7

(22) 申请日 2023.06.09

(30) 优先权数据

2022-094577 2022.06.10 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.02.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/021621 2023.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/238949 JA 2023.12.14

(71) 申请人 富士胶片戴奥辛思生物技术英国有限公司

地址 英国比灵赫姆

(72) 发明人 松浦达也 黑田明里

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 张桂霞 黄念

(51) Int.Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

权利要求书6页 说明书27页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

细胞的制备方法、异源多聚体蛋白质的制造方法、双特异性抗体的制造方法、载体组、哺乳动物细胞、CHO细胞和细胞池的制备方法

(57) 摘要

将载体组导入宿主细胞中,从导入载体组的宿主细胞中选择生产异源多聚体蛋白质的细胞。载体组为第1表达载体和第2表达载体的组,作为构成异源多聚体蛋白质的亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,从构成异源多聚体蛋白质的亚基中除去亚基X后剩余的亚基Y的表达盒按照种类包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。

1. 细胞的制备方法, 其为制备生产由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质的细胞的方法 (n为2以上的整数), 该方法包括:

将下述载体组导入宿主细胞中、和

从导入了上述载体组的宿主细胞中选择产生异源多聚体蛋白质的细胞;

载体组: 为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

作为上述n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体两者中,

从上述n种亚基中除去上述亚基X后剩余的亚基Y的表达盒按照种类包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体的一者中。

2. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

上述载体组为下述载体组;

载体组: 为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

作为上述n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体两者中,

从上述n种亚基中除去上述亚基X后剩余的亚基Y的表达盒全部包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体的一者中。

3. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由2种以上且6种以下亚基构成的异源多聚体蛋白质,

上述至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。

4. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种或4种亚基构成的异源多聚体蛋白质,

上述至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。

5. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种亚基构成的异源多聚体蛋白质,

上述至少1种亚基X为1种或2种的亚基X。

6. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中上述异源多聚体蛋白质为抗体。

7. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中上述异源多聚体蛋白质为双特异性抗体。

8. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。

9. 根据权利要求8所述的细胞的制备方法, 其中上述启动子为hEF-1 α 启动子。

10. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

在包含上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中, 构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

11. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法, 其中

构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

12. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法,其中
上述第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,
上述第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。

13. 根据权利要求12所述的细胞的制备方法,其中
上述第1选择标记和上述第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,
上述第1选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种,

上述第2选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。

14. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法,其中上述宿主细胞为哺乳动物细胞。

15. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法,其中上述宿主细胞为CHO细胞。

16. 根据权利要求1所述的细胞的制备方法,其中上述宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁺细胞或来源于这些细胞的株化细胞。

17. 细胞的制备方法,其为制备生产由第一H链、第二H链以及上述第一H链和上述第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的细胞的方法,该方法包括:

将下述载体组导入宿主细胞中、和

从导入了上述载体组的宿主细胞中选择生产双特异性抗体的细胞;

载体组:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

上述第1表达载体和上述第2表达载体两者包含上述L链的表达盒,

上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含上述第一H链的表达盒,

上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含上述第二H链的表达盒。

18. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法,其中

上述第1表达载体和上述第2表达载体各自包含1个上述L链的表达盒,

上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含1个上述第一H链的表达盒,

上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含1个上述第二H链的表达盒。

19. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法,其中构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。

20. 根据权利要求19所述的细胞的制备方法,其中上述启动子为hEF-1 α 启动子。

21. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法,其中

构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

在包含上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

22. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法,其中

构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

23. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法, 其中
上述第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,
上述第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。

24. 根据权利要求23所述的细胞的制备方法, 其中
上述第1表达载体包含上述L链的表达盒、上述第一H链的表达盒、上述第二H链的表达盒和上述第1选择标记的表达盒,

上述第2表达载体包含上述L链的表达盒和上述第2选择标记的表达盒。

25. 根据权利要求24所述的细胞的制备方法, 其中
上述第1选择标记和上述第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,
上述第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因。

26. 根据权利要求24所述的细胞的制备方法, 其中
上述第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因,
上述第2选择标记为抗生素抗性基因。

27. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法, 其中上述宿主细胞为哺乳动物细胞。

28. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法, 其中上述宿主细胞为CHO细胞。

29. 根据权利要求17所述的细胞的制备方法, 其中上述宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞或来源于这些细胞的株化细胞。

30. 异源多聚体蛋白质的制造方法, 其包括培养通过根据权利要求1~权利要求16中任1项所述的细胞的制备方法制备的细胞。

31. 双特异性抗体的制造方法, 其包括培养通过根据权利要求17~权利要求29中任1项所述的细胞的制备方法制备的细胞。

32. 载体组, 其为表达由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质的载体组 (n为2以上的整数),

为第1表达载体和第2表达载体的组,

作为上述n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体两者中,

从上述n种亚基中除去上述亚基X后剩余的亚基Y的表达盒按照种类包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体的一者中。

33. 根据权利要求32所述的载体组, 其为上述第1表达载体和上述第2表达载体的组,

作为上述n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体两者中,

从上述n种亚基中除去上述亚基X后剩余的亚基Y的表达盒全部包含在上述第1表达载体和上述第2表达载体的一者中。

34. 根据权利要求32所述的载体组, 其中

上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由2种以上且6种以下亚基构成的异源多聚体蛋白质,

上述至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。

35. 根据权利要求32所述的载体组,其中
上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种或4种亚基构成的异源多聚体蛋白质,
上述至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。
36. 根据权利要求32所述的载体组,其中
上述由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种亚基构成的异源多聚体蛋白质,
上述至少1种亚基X为1种或2种的亚基X。
37. 根据权利要求32所述的载体组,其中上述异源多聚体蛋白质为抗体。
38. 根据权利要求32所述的载体组,其中上述异源多聚体蛋白质为双特异性抗体。
39. 根据权利要求32所述的载体组,其中构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。
40. 根据权利要求39所述的载体组,其中上述启动子为hEF-1 α 启动子。
41. 根据权利要求32所述的载体组,其中
构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
在包含上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
42. 根据权利要求32所述的载体组,其中
构成上述异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
43. 根据权利要求32所述的载体组,其中
上述第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,
上述第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。
44. 根据权利要求43所述的载体组,其中
上述第1选择标记和上述第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,
上述第1选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种,
上述第2选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。
45. 载体组,其为表达由第一H链、第二H链以及上述第一H链和上述第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的载体组,
为第1表达载体和第2表达载体的组,
上述第1表达载体和上述第2表达载体两者包含上述L链的表达盒,
上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含上述第一H链的表达盒,
上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含上述第二H链的表达盒。
46. 根据权利要求45所述的载体组,其中
上述第1表达载体和上述第2表达载体各自包含1个上述L链的表达盒,

上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含1个上述第一H链的表达盒，
上述第1表达载体和上述第2表达载体中的一者包含1个上述第二H链的表达盒。

47. 根据权利要求45所述的载体组，其中构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。

48. 根据权利要求47所述的载体组，其中上述启动子为hEF-1 α 启动子。

49. 根据权利要求45所述的载体组，其中
构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列，

在包含上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中，构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

50. 根据权利要求45所述的载体组，其中
构成上述双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列，
构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于上述纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

51. 根据权利要求45所述的载体组，其中
上述第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒，
上述第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。

52. 根据权利要求51所述的载体组，其中
上述第1表达载体包含上述L链的表达盒、上述第一H链的表达盒、上述第二H链的表达盒和上述第1选择标记的表达盒，
上述第2表达载体包含上述L链的表达盒和上述第2选择标记的表达盒。

53. 根据权利要求52所述的载体组，其中
上述第1选择标记和上述第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记，
上述第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因。

54. 根据权利要求52所述的载体组，其中
上述第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因，
上述第2选择标记为抗生素抗性基因。

55. 用根据权利要求32～权利要求54中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞。

56. 用根据权利要求32～权利要求54中任1项所述的载体组转染的CHO细胞。

57. 哺乳动物细胞，其为用根据权利要求45～权利要求54中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞，

当将上述第一H链的mRNA量设为1时，上述第二H链的mRNA量为0.5～2，上述L链的mRNA量为2～10。

58. 哺乳动物细胞，其为用根据权利要求45～权利要求54中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞，

当将上述第一H链的mRNA量设为1时，上述第二H链的mRNA量为0.625～1.6，上述L链的mRNA量为3～8。

59. CHO细胞，其为用根据权利要求45～权利要求54中任1项所述的载体组转染的CHO细胞，

当将上述第一H链的mRNA量设为1时,上述第二H链的mRNA量为0.5~2,上述L链的mRNA量为2~10。

60. CHO细胞,其为用根据权利要求45~权利要求54中任1项所述的载体组转染的CHO细胞,

当将上述第一H链的mRNA量设为1时,上述第二H链的mRNA量为0.625~1.6,上述L链的mRNA量为3~8。

61. 细胞池的制备方法,其包括将根据权利要求32~权利要求54中任1项所述的载体组导入宿主细胞中。

62. 根据权利要求61所述的细胞池的制备方法,其中上述宿主细胞为哺乳动物细胞。

63. 根据权利要求61所述的细胞池的制备方法,其中上述宿主细胞为CHO细胞。

64. 根据权利要求61所述的细胞池的制备方法,其中上述宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞或来源于这些细胞的株化细胞。

细胞的制备方法、异源多聚体蛋白质的制造方法、双特异性抗体的制造方法、载体组、哺乳动物细胞、CHO细胞和细胞池的制备方法

技术领域

[0001] 本公开涉及细胞的制备方法、异源多聚体蛋白质的制造方法、双特异性抗体的制造方法、载体组、哺乳动物细胞、CHO细胞和细胞池的制备方法。

背景技术

[0002] 专利文献1中公开了选择双特异性抗体的表达细胞的方法,其包含使用慢病毒向真核细胞中转导。

[0003] 专利文献2中公开了培养包含双特异性抗HER2抗体的表达载体的宿主细胞来制造双特异性抗HER2抗体。

[0004] 专利文献3中公开了多特异性抗原结合分子,其包含(1)包含具有磷脂酰肌醇蛋白聚糖(Glypican)3结合活性的抗体可变区的结构域、(2)包含具有T细胞受体复合物结合活性的抗体可变区的结构域和(3)包含针对Fc γ 受体的结合活性降低的Fc区的结构域,(1)的可变区和(2)的可变区中所含的L链可变区为共同的氨基酸序列。

[0005] 专利文献4中公开了多特异性抗原结合分子,其包含识别凝血因子IX的第一抗原结合位点和识别凝血因子X的第二抗原结合位点,具有代替凝血因子VIII功能的功能。

[0006] 专利文献5中公开了包含结合至CD40的抗原结合结构域和结合至EpCAM的抗原结合结构域的双特异性抗体。

[0007] 专利文献6中公开了具有共同轻链和彼此不同的2条重链的双特异性抗HER2抗体。

[0008] 专利文献7中公开了结合至PD-1的细胞外部分和TIM-3的细胞外部分的双特异性抗体。

[0009] 专利文献8中公开了结合至hPD-L1和TIGIT或LAG-3的双特异性抗体。

[0010] 专利文献9中公开了结合至CD38和PD-L1的双特异性抗体。

[0011] 专利文献10中公开了促进宿主细胞中生产的靶多肽的分泌的纤连蛋白分泌先导物。

[0012] 现有技术文献

[0013] 专利文献

[0014] 专利文献1:日本特表2015-503907号公报

[0015] 专利文献2:日本特表2017-501706号公报

[0016] 专利文献3:国际公开第2016/047722号

[0017] 专利文献4:国际公开第2012/067176号

[0018] 专利文献5:国际公开第2019/093342号

[0019] 专利文献6:日本特表2018-504113号公报

[0020] 专利文献7:日本特表2020-532281号公报

[0021] 专利文献8:日本特表2019-528083号公报

[0022] 专利文献9:日本特表2019-516396号公报

[0023] 专利文献10:国际公开第2014/177826号

发明内容

[0024] 发明所要解决的课题

[0025] 以往,出于制备生产异源多聚体蛋白质的细胞的目的,进行了将构成异源多聚体蛋白质的亚基(subunit)的表达载体导入宿主细胞中。例如,在异源多聚体蛋白质由1个亚基A、1个亚基B和1个亚基C构成的情况下,将包含亚基A的表达盒、亚基B的表达盒和亚基C的表达盒各1个的表达载体导入宿主细胞中。简单预测的话,上述3种亚基以1:1:1的表达量比进行表达,生成异源多聚体蛋白质。然而现实中,异源多聚体蛋白质的表达量或纯度低,异源多聚体蛋白质的生产量有时达不到期待值。作为其理由,考虑每种亚基的转录率或翻译率不同;一部分亚基易于分解;特定种类的亚基的个数过剩时全部亚基都聚集等。

[0026] 作为提高异源多聚体蛋白质的表达量或纯度的手段,考虑预先知道亚基表达量的最适比,以按照该比例的个数比将亚基的表达盒置于1个表达载体中。然而,知道亚基表达量的最适比未必容易。另外,亚基表达量的最适比为比较大的整数的情况下(例如1:2:3),置于1个表达载体中的表达盒的总个数变多。其结果,表达载体的大小变大,向宿主细胞中的导入率降低。

[0027] 作为提高异源多聚体蛋白质的表达量或纯度的其他手段,考虑将亚基的表达盒各自置于单独的表达载体中,向宿主细胞中导入多种表达载体。例如,在异源多聚体蛋白质由亚基A、亚基B和亚基C构成的情况下,将亚基A的表达载体A、亚基B的表达载体B和亚基C的表达载体C导入宿主细胞中。对于宿主细胞中导入的表达载体A、表达载体B和表达载体C的个数,每个宿主细胞都有偏差,因此宿主细胞中拥有的各表达盒的个数产生多样性。从多种宿主细胞中,选择异源多聚体蛋白质的表达量或纯度高的细胞。但是,需要构建与构成异源多聚体蛋白质的亚基种类数相同的种类数的表达载体,并且需要备齐与亚基种类数相同的种类数的选择标记。

[0028] 本公开提供与上述2种手段不同的手段作为提高异源多聚体蛋白质的表达量或纯度的手段。

[0029] 本公开的一个实施方案以提供异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的生产性优异的细胞的制备方法为课题。

[0030] 本公开的一个实施方案以提供生产性优异的异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的制造方法为课题。

[0031] 本公开的一个实施方案以提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的细胞的制备中使用的载体组为课题。

[0032] 本公开的一个实施方案以提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的哺乳动物细胞和CHO细胞为课题。

[0033] 本公开的一个实施方案以提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的细胞的筛选中使用的细胞池的制备方法为课题。

[0034] 用于解决课题的手段

[0035] 本公开细胞的制备方法将第1表达载体和第2表达载体(即2种表达载体)导入宿主

细胞中,以表达异源多聚体蛋白质。

[0036] 在第1表达载体和第2表达载体两者中,放置有所关注的亚基(通常为想增强表达的亚基)的表达盒。所关注的亚基可为1种或2种以上。所关注的亚基以外的其余亚基的表达盒按照种类置于第1表达载体和第2表达载体的任意一者中。

[0037] 通过向宿主细胞中导入第1表达载体和第2表达载体两者,保证了全部亚基的表达。由于所关注的亚基的表达盒存在于第1表达载体和第2表达载体两者中,因此导入量变得较多,可增强所关注的亚基的表达。

[0038] 对于宿主细胞中导入的第1表达载体和第2表达载体的个数,每个宿主细胞都有偏差,因此宿主细胞中拥有的各表达盒的个数产生多样性。从多种宿主细胞中选择满足评价标准(例如异源多聚体蛋白质的表达量或纯度)的细胞。

[0039] 用于解决课题的具体手段中含有以下方案。

[0040] <1>细胞的制备方法,其为制备生产由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质的细胞的方法(n为2以上的整数),该方法包括:

[0041] 将载体组导入宿主细胞中、和

[0042] 从导入载体组的宿主细胞中选择产生异源多聚体蛋白质的细胞;

[0043] 载体组:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

[0044] 作为n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,

[0045] 从n种亚基中除去亚基X后剩余的亚基Y的表达盒按照种类包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。

[0046] <2>根据<1>所述的细胞的制备方法,其中

[0047] 载体组为下述载体组;

[0048] 载体组:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

[0049] 作为n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,

[0050] 从n种亚基中除去亚基X后剩余的亚基Y的表达盒全部包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。

[0051] <3>根据<1>或<2>所述的细胞的制备方法,其中

[0052] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由2种以上且6种以下亚基构成的异源多聚体蛋白质,

[0053] 至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。

[0054] <4>根据<1>或<2>所述的细胞的制备方法,其中

[0055] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种或4种亚基构成的异源多聚体蛋白质,

[0056] 至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。

[0057] <5>根据<1>或<2>所述的细胞的制备方法,其中

[0058] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种亚基构成的异源多聚体蛋白质,

[0059] 至少1种亚基X为1种或2种的亚基X。

[0060] <6>根据<1>~<5>中任1项所述的细胞的制备方法,其中异源多聚体蛋白质为抗

体。

[0061] <7>根据<1>~<5>中任1项所述的细胞的制备方法,其中异源多聚体蛋白质为双特异性抗体。

[0062] <8>根据<1>~<7>中任1项所述的细胞的制备方法,其中构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。

[0063] <9>根据<8>所述的细胞的制备方法,其中启动子为hEF-1 α 启动子。

[0064] <10>根据<1>~<9>中任1项所述的细胞的制备方法,其中

[0065] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

[0066] 在包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0067] <11>根据<1>~<9>中任1项所述的细胞的制备方法,其中

[0068] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,

[0069] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0070] <12>根据<1>~<11>中任1项所述的细胞的制备方法,其中

[0071] 第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,

[0072] 第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。

[0073] <13>根据<12>所述的细胞的制备方法,其中

[0074] 第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,

[0075] 第1选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种,

[0076] 第2选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。

[0077] <14>根据<1>~<13>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0078] <15>根据<1>~<13>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞,Chinese hamster ovary cell)。

[0079] <16>根据<1>~<13>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞或来源于这些细胞的株化细胞。

[0080] <17-1>根据<1>所述的细胞的制备方法,其中

[0081] 异源多聚体蛋白质为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体,

[0082] 亚基X为L链,亚基Y为第一H链和第二H链,

[0083] 载体组为下述载体组;

[0084] 载体组:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,

[0085] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒,

[0086] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,

- [0087] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第二H链的表达盒。
- [0088] <17-2>细胞的制备方法,其为制备生产由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的细胞的方法,该方法包括:
- [0089] 将载体组导入宿主细胞中、和
- [0090] 从导入载体组的宿主细胞中选择生产双特异性抗体的细胞;
- [0091] 载体组:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,
- [0092] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒,
- [0093] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,
- [0094] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第二H链的表达盒。
- [0095] <17-3>根据<17-1>或<17-2>中任1项所述的细胞的制备方法,其中第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒和第二H链的表达盒。
- [0096] <17-4>根据<17-1>~<17-3>中任1项所述的细胞的制备方法,其中
- [0097] 第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒和第二H链的表达盒,
- [0098] 第2表达载体包含L链的表达盒。
- [0099] <17-5>根据<17-1>~<17-4>中任1项所述的细胞的制备方法,其中双特异性抗体为由1个第一H链、1个第二H链和2个L链构成的4聚体。
- [0100] <18-1>根据<17-1>~<17-5>中任1项所述的细胞的制备方法,其中
- [0101] 第1表达载体和第2表达载体各自包含1个L链的表达盒,
- [0102] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第一H链的表达盒,
- [0103] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第二H链的表达盒。
- [0104] <18-2>根据<1>所述的细胞的制备方法,其中
- [0105] 异源多聚体蛋白质为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体,
- [0106] 亚基X为L链和scFv-Fc,亚基Y为H链,
- [0107] 载体组为下述载体组A;
- [0108] 载体组A:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,
- [0109] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒,
- [0110] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒。
- [0111] <18-3>根据<1>所述的细胞的制备方法,其中
- [0112] 异源多聚体蛋白质为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体,
- [0113] 亚基X为scFv-Fc,亚基Y为H链和L链,
- [0114] 载体组为下述载体组B;
- [0115] 载体组B:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组
- [0116] 第1表达载体和第2表达载体两者包含scFv-Fc的表达盒,
- [0117] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,
- [0118] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含L链的表达盒。
- [0119] <18-4>细胞的制备方法,其为制备生产由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体的细胞的方法,该方法包括:
- [0120] 将载体组A或B导入宿主细胞中、和
- [0121] 从导入载体组A或B的宿主细胞中选择生产双特异性抗体的细胞;

- [0122] 载体组A:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,
- [0123] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒,
- [0124] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒;
- [0125] 载体组B:为第1表达载体和第2表达载体的组的载体组,
- [0126] 第1表达载体和第2表达载体两者包含scFv-Fc的表达盒,
- [0127] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,
- [0128] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含L链的表达盒。
- [0129] <18-5>根据<18-2>~<18-4>中任1项所述的细胞的制备方法,其中双特异性抗体为由1个H链、1个L链和1个scFv-Fc构成的3聚体。
- [0130] <19>根据<17-1>~<17-5>和<18-1>~<18-5>中任1项所述的细胞的制备方法,其中构成双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。
- [0131] <20>根据<19>所述的细胞的制备方法,其中启动子为hEF-1 α 启动子。
- [0132] <21>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>、<19>和<20>中任1项所述的细胞的制备方法,其中
- [0133] 构成双特异性抗体的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0134] 在包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
- [0135] <22>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>、<19>和<20>中任1项所述的细胞的制备方法,其中
- [0136] 构成双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0137] 构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
- [0138] <23>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>和<19>~<22>中任1项所述的细胞的制备方法,其中
- [0139] 第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,
- [0140] 第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。
- [0141] <24>根据<23>所述的细胞的制备方法,其中
- [0142] 第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒、第二H链的表达盒和第1选择标记的表达盒,
- [0143] 第2表达载体包含L链的表达盒和第2选择标记的表达盒。
- [0144] <25>根据<24>所述的细胞的制备方法,其中
- [0145] 第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,
- [0146] 第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因。
- [0147] <26>根据<24>所述的细胞的制备方法,其中
- [0148] 第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因,
- [0149] 第2选择标记为抗生素抗性基因。
- [0150] <27>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>和<19>~<26>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为哺乳动物细胞。

- [0151] <28>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>和<19>~<26>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞,Chinese hamster ovary cell)。
- [0152] <29>根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>和<19>~<26>中任1项所述的细胞的制备方法,其中宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞或来源于这些细胞的株化细胞。
- [0153] <30>异源多聚体蛋白质的制造方法,其包括
- [0154] 培养通过根据<1>~<16>中任1项所述的细胞的制备方法制备的细胞。
- [0155] <31>双特异性抗体的制造方法,其包括
- [0156] 培养通过根据<17-1>~<17-5>、<18-1>~<18-5>和<19>~<29>中任1项所述的细胞的制备方法制备的细胞。
- [0157] <32>载体组,其为表达由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质的载体组(n为2以上的整数),
- [0158] 为第1表达载体和第2表达载体的组,
- [0159] 作为n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,
- [0160] 从n种亚基中除去亚基X后剩余的亚基Y的表达盒按照种类包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。
- [0161] <33>根据<32>所述的载体组,其为第1表达载体和第2表达载体的组,
- [0162] 作为n种亚基的一部分的至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,
- [0163] 从n种亚基中除去亚基X后剩余的亚基Y的表达盒全部包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。
- [0164] <34>根据<32>或<33>所述的载体组,其中
- [0165] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由2种以上且6种以下亚基构成的异源多聚体蛋白质,
- [0166] 至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。
- [0167] <35>根据<32>或<33>所述的载体组,其中
- [0168] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种或4种亚基构成的异源多聚体蛋白质,
- [0169] 至少1种亚基X为1种、2种或3种的亚基X。
- [0170] <36>根据<32>或<33>所述的载体组,其中
- [0171] 由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质为由3种亚基构成的异源多聚体蛋白质,
- [0172] 至少1种亚基X为1种或2种的亚基X。
- [0173] <37>根据<32>~<36>中任1项所述的载体组,其中异源多聚体蛋白质为抗体。
- [0174] <38>根据<32>~<36>中任1项所述的载体组,其中异源多聚体蛋白质为双特异性抗体。
- [0175] <39>根据<32>~<38>中任1项所述的载体组,其中构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。
- [0176] <40>根据<39>所述的载体组,其中启动子为hEF-1 α 启动子。

- [0177] <41>根据<32>~<40>中任1项所述的载体组,其中
- [0178] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0179] 在包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
- [0180] <42>根据<32>~<40>中任1项所述的载体组,其中
- [0181] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0182] 构成异源多聚体蛋白质的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
- [0183] <43>根据<32>~<42>中任1项所述的载体组,其中
- [0184] 第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒,
- [0185] 第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。
- [0186] <44>根据<43>所述的载体组,其中
- [0187] 第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,
- [0188] 第1选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种,
- [0189] 第2选择标记为选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。
- [0190] <45-1>根据<32>所述的载体组,其中
- [0191] 异源多聚体蛋白质为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体,
- [0192] 亚基X为L链,亚基Y为第一H链和第二H链,
- [0193] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒,
- [0194] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,
- [0195] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第二H链的表达盒。
- [0196] <45-2>载体组,其为表达由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的载体组,
- [0197] 为第1表达载体和第2表达载体的组,
- [0198] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒,
- [0199] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,
- [0200] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第二H链的表达盒。
- [0201] <45-3>根据<45-1>和<45-2>所述的载体组,其中第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒和第二H链的表达盒。
- [0202] <45-4>根据<45-1>~<45-3>中任1项所述的载体组,其中
- [0203] 第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒和第二H链的表达盒,
- [0204] 第2表达载体包含L链的表达盒。
- [0205] <45-5>根据<45-1>~<45-4>中任1项所述的载体组,其中双特异性抗体为由1个第一H链、1个第二H链和2个L链构成的4聚体。

- [0206] <46-1>根据<45-1>~<45-5>中任1项所述的载体组,其中
- [0207] 第1表达载体和第2表达载体各自包含1个L链的表达盒,
- [0208] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第一H链的表达盒,
- [0209] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第二H链的表达盒。
- [0210] <46-2>根据<32>所述的载体组,其中
- [0211] 异源多聚体蛋白质为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体,
- [0212] 亚基X为L链和scFv-Fc,亚基Y为H链,
- [0213] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒,
- [0214] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒。
- [0215] <46-3>根据<32>所述的载体组,其中
- [0216] 异源多聚体蛋白质为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体,
- [0217] 亚基X为scFv-Fc,亚基Y为H链和L链,
- [0218] 第1表达载体和第2表达载体两者包含scFv-Fc的表达盒,
- [0219] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,
- [0220] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含L链的表达盒。
- [0221] <46-4>载体组,其为表达由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体的载体组,
- [0222] 为第1表达载体和第2表达载体的组,
- [0223] 第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒,
- [0224] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒。
- [0225] <46-5>载体组,其为表达由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体的载体组,
- [0226] 为第1表达载体和第2表达载体的组,
- [0227] 第1表达载体和第2表达载体两者包含scFv-Fc的表达盒,
- [0228] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,
- [0229] 第1表达载体和第2表达载体中的一者包含L链的表达盒。
- [0230] <46-6>根据<46-2>~<46-5>中任1项所述的载体组,其中双特异性抗体为由H链、L链和scFv-Fc构成的3聚体。
- [0231] <47>根据<45-1>~<45-5>和<46-1>~<46-6>中任1项所述的载体组,其中构成双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。
- [0232] <48>根据<47>所述的载体组,其中启动子为hEF-1 α 启动子。
- [0233] <49>根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>、<47>和<48>中任1项所述的载体组,其中
- [0234] 构成双特异性抗体的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0235] 在包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的表达盒中,构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。
- [0236] <50>根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>、<47>和<48>中任1项所述的载体组,其中
- [0237] 构成双特异性抗体的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列,
- [0238] 构成双特异性抗体的亚基的编码序列以相同阅读框配置于纤连蛋白分泌先导物

的编码序列的下游。

[0239] <51>根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<50>中任1项所述的载体组，其中

[0240] 第1表达载体进一步包含第1选择标记的表达盒，

[0241] 第2表达载体进一步包含第2选择标记的表达盒。

[0242] <52>根据<51>所述的载体组，其中

[0243] 第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒、第二H链的表达盒和第1选择标记的表达盒，

[0244] 第2表达载体包含L链的表达盒和第2选择标记的表达盒。

[0245] <53>根据<52>所述的载体组，其中

[0246] 第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记，

[0247] 第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因。

[0248] <54>根据<52>所述的载体组，其中

[0249] 第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因，

[0250] 第2选择标记为抗生素抗性基因。

[0251] <55>用根据<32>~<44>、<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞。

[0252] <56>用根据<32>~<44>、<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞,Chinese hamster ovary cell)。

[0253] <57>哺乳动物细胞,其为用根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞，

[0254] 当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.5~2,L链的mRNA量为2~10。

[0255] <58>哺乳动物细胞,其为用根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的哺乳动物细胞，

[0256] 当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.625~1.6,L链的mRNA量为3~8。

[0257] <59>CHO细胞,其为用根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的CHO细胞，

[0258] 当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.5~2,L链的mRNA量为2~10。

[0259] <60>CHO细胞,其为用根据<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组转染的CHO细胞，

[0260] 当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.625~1.6,L链的mRNA量为3~8。

[0261] <61>细胞池的制备方法,其包括

[0262] 将根据<32>~<44>、<45-1>~<45-5>、<46-1>~<46-6>和<47>~<54>中任1项所述的载体组导入宿主细胞中。

[0263] <62>根据<61>所述的细胞池的制备方法,其中宿主细胞为哺乳动物细胞。

[0264] <63>根据<61>所述的细胞池的制备方法,其中宿主细胞为CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞,Chinese hamster ovary cell)。

[0265] <64>根据<61>所述的细胞池的制备方法,其中宿主细胞为CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞或来源于这些细胞的株化细胞。

[0266] 发明效果

[0267] 根据本公开的一个实施方案(方式),提供异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的生产性优异的细胞的制备方法。

[0268] 根据本公开的一个实施方案,提供生产性优异的异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的制造方法。

[0269] 根据本公开的一个实施方案,提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的细胞的制备中使用的载体组。

[0270] 根据本公开的一个实施方案,提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的哺乳动物细胞和CHO细胞。

[0271] 根据本公开的一个实施方案,提供生产异源多聚体蛋白质或双特异性抗体的细胞的筛选中使用的细胞池的制备方法。

附图说明

[0272] [图1]为实施例中构建的表达载体1的载体图谱。

[0273] [图2]为实施例中构建的表达载体2的载体图谱。

[0274] [图3]为实施例中构建的表达载体3的载体图谱。

[0275] [图4]为实施例中构建的表达载体4的载体图谱。

[0276] [图5]为显示实施例中制备的双特异性抗体(BiAb1和BiAb2)结构的概念图。

具体实施方式

[0277] 以下说明本公开的实施方案。这些说明和实施例为对实施方案的例示,并非对实施方案范围的限制。本公开中所述的作用机制包含推测,其正确与否并非对实施方案范围的限制。

[0278] 本公开中,使用“~”显示的数值范围表示包含分别以“~”的前后所记载的数值为最小值和最大值的范围。

[0279] 在本公开中分阶段记载的数值范围中,以一个数值范围记载的上限值或下限值可置换为其他分阶段记载的数值范围的上限值或下限值。另外,在本公开中记载的数值范围中,该数值范围的上限值或下限值可置换为实施例中的值。

[0280] 本公开中,各成分可含有多种相应物质。在本公开中提及组合物中各成分的量的情况下,在组合物中存在多种与各成分相对应的物质的情况下,除非另外说明,否则意指组合物中存在的多种物质的合计量。

[0281] 本公开中,核酸为包含所有核酸(例如DNA、RNA、它们的类似物、天然物、人工物)和在所有核酸上连接有低分子化合物、基团(group,例如甲基)、核酸以外的分子、构建体等的核酸的术语。核酸可为单链或双链。

[0282] 本公开中,载体为具有将外源性核酸运送进细胞的作用的物质,其自身为核酸。表

达载体意指基于其核酸序列而表达多肽的载体。对载体和表达载体的大小和碱基序列没有限制。载体和表达载体优选为双链DNA。

[0283] 本公开中,多肽是指氨基酸通过肽键连接的分子。对多肽的氨基酸残基数没有限制,多肽为包含蛋白质的术语。期望本公开中的多肽的氨基酸残基数为6个残基以上。多肽中包含氨基酸经翻译后修饰的多肽。作为氨基酸的翻译后修饰,可列举磷酸化、甲基化、乙酰化等。

[0284] 本公开中,氨基酸的表示法使用IUPAC-IUBMB JCBN (IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)所规定的3字母表示法和1字母表示法。本公开中提及的氨基酸除非另外说明,否则为L-氨基酸。

[0285] 本公开中,异源多聚体蛋白质意指至少2种亚基聚集而成的蛋白质。1个亚基意指构成多聚体蛋白质的单个多肽。作为构成多聚体蛋白质的多肽,其中多个多肽以1个或多个肽接头连接的1个多肽相当于1个亚基。换言之,异源多聚体蛋白质是指通过相互独立地表达的至少2种编码序列制作的蛋白质。由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质通过相互独立地表达的n种编码序列表达(n为2以上的整数)。

[0286] 作为异源多聚体蛋白质的实例,可列举抗体、Fc融合蛋白质、酶、白细胞介素、细胞因子、趋化因子、肽激素、生长因子、转录因子、受体、受体片段、治疗用蛋白质、病毒、病毒样颗粒和疫苗。

[0287] 本公开中,抗体不限定于免疫球蛋白,只要是与抗原结合的分子即可。本公开中,抗体为包含抗体片段和抗原结合分子的术语。抗体包含一价抗体和多价抗体中的任何一种。抗体包含免疫球蛋白分子本身(完整的免疫球蛋白,intact immunoglobulin)、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、单链抗体(scFv)、双链抗体和它们的变体中的任何一种。抗体具有被称为抗体结合簇(paratope)的抗原识别位点,抗体结合簇与抗原结合。

[0288] 一般的IgG包含氨基酸序列相同的2个重链(HC)和氨基酸序列相同的2个轻链(LC),具有HC彼此通过二硫键连接并且HC和LC通过二硫键连接的结构。HC包含可变区(VH)和恒定区(CH1、CH2和CH3),LC包含可变区(VL)和恒定区(CL)。

[0289] 作为抗体的实例,可列举具有人类可变区和人类恒定区的人类抗体;具有小鼠可变区和小鼠恒定区的小鼠抗体;组合了来源于多种动物的区域的嵌合抗体;具有小鼠可变区和人类恒定区的人源化抗体;具有骆驼科动物的重链可变区和人类Fc区的人源化抗体等。

[0290] 作为抗体的实例,可列举双特异性抗体和多特异性抗体。双特异性抗体意指可与2种表位同时结合的抗体。多特异性抗体意指可与3种以上表位同时结合的抗体。双特异性抗体的结构和表位结合位点的个数不受限制。多特异性抗体的结构和表位结合位点的个数不受限制。

[0291] 作为双特异性抗体的实例,由可列举第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体。需要说明的是,本公开中,2种H链共同的L链意指与2种H链配对的1种L链。该双特异性抗体的一个实例为由1个第一H链、1个第二H链和2个L链通过二硫键连接的4聚体。第一H链、第二H链和L链各自可至少包含用于识别抗原的区域和用于形成抗体的区域。

[0292] 作为双特异性抗体的进一步实例,可列举由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗

体。scFv为免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区的融合蛋白质,scFv-Fc为scFv和Fc区的融合蛋白质。该双特异性抗体的一个实例为1个H链、1个L链和1个scFv-Fc通过二硫键连接而得的3聚体。

[0293] 双特异性抗体只要具有识别第1抗原的臂和识别第2抗原的臂即可,对抗原和结构没有限定。作为双特异性抗体的实例,可列举艾美赛珠单抗(Emicizumab)、贝林妥单抗(Blinatumomab)、伐努赛珠单抗(Vanucizumab)、艾司妥单抗(Istiratumab)、帕妥昔珠单抗(Pasotuxizumab)、度戈妥珠单抗(Duligotuzumab)、度妥昔珠单抗(Duvortuxizumab)、法瑞西单抗(Faricimab)。

[0294] 本公开的一个实施方案为生产异源多聚体蛋白质的细胞的制备方法。细胞的制备方法包括将第1表达载体和第2表达载体的载体组导入宿主细胞中,以及从导入载体组的宿主细胞中选择产生异源多聚体蛋白质的细胞。

[0295] 本公开中,“载体组”意指第1表达载体和第2表达载体的组。

[0296] 本公开中,在说明第1表达载体和第2表达载体共同的事项的情况下,将第1表达载体和第2表达载体统称为“表达载体”。

[0297] 宿主细胞可为原核细胞或真核细胞。作为原核细胞的实例,可列举细菌细胞。作为真核细胞的实例,可列举酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。作为宿主细胞,优选真核细胞,更优选哺乳动物细胞。

[0298] 作为细菌细胞的实例,可列举大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*,铜绿假单胞菌)等革兰氏阴性细菌细胞;枯草杆菌(*Bacillus subtilis*,枯草芽孢杆菌)等革兰氏阳性细菌细胞。优选的细菌细胞为肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*),更优选为大肠杆菌,特别是B株或K12株。

[0299] 作为酵母的实例,可列举出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯得毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)。

[0300] 作为昆虫细胞的实例,可列举来源于家蚕(*Bombyx mori*)的BmN细胞、来源于夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的Sf9细胞和Sf21细胞、来源于果蝇(*Drosophila melanogaster*)的S2细胞以及来源于嗜眠摇蚊(*Polypedilum vanderplanki*)的Pv11细胞。

[0301] 作为哺乳动物细胞的实例,可列举中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、幼仓鼠肾脏细胞(BHK细胞)、人胚肾细胞株(例如HEK293细胞)、人成视网膜细胞瘤衍生的细胞株(human retinoblastoma-derived cell lines)(例如PER.C6细胞)和小鼠骨髓瘤细胞株(例如NS0细胞和SP2/0细胞)。

[0302] 宿主细胞优选为中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。作为CHO细胞的实例,可列举CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞和来源于这些细胞的株化细胞。

[0303] 作为将表达载体导入宿主细胞中的手段的实例,可列举电穿孔、脂质转染、显微注射和病毒载体的细胞感染。出于安全性高、导入效率高和细胞毒性低的观点,优选电穿孔。另外,出于在将多种表达载体导入细胞时不因表达载体的种类而偏离地以高均匀性导入细胞内和染色体内的观点,优选电穿孔。

[0304] 对将第1表达载体和第2表达载体导入宿主细胞中的顺序没有限制。可将第1表达载体和第2表达载体一起导入宿主细胞中或分别导入宿主细胞中。出于缩短目标细胞的制

备所需的工序和时间的观点,优选将第1表达载体和第2表达载体一起导入宿主细胞中。

[0305] 在将第1表达载体和第2表达载体一起导入宿主细胞中的情况下,准备包含两种表达载体的载体溶液。在该载体溶液中,第1表达载体和第2表达载体的摩尔浓度比为例如1:5~5:1、1:2~2:1或1:1。

[0306] 在将第1表达载体和第2表达载体分别导入宿主细胞中的情况下,准备包含第1表达载体的载体溶液和包含第2表达载体的载体溶液。两种载体溶液的表达载体的摩尔浓度比为例如1:5~5:1、1:2~2:1或1:1。在将两种载体溶液分别与宿主细胞接触以导入两种载体的情况下,与宿主细胞接触的第1表达载体和第2表达载体的摩尔比优选为例如1:5~5:1、1:2~2:1或1:1。

[0307] 对第1表达载体和第2表达载体的大小没有限定。

[0308] 第1表达载体的大小为例如400bp~5万bp(碱基对,base pair)、600bp~2万bp或800bp~1万bp。

[0309] 第2表达载体大小为例如400bp~5万bp(碱基对)、600bp~2万bp或800bp~1万bp。

[0310] 导入宿主细胞中的表达载体可整合至宿主细胞的基因组内,也可整合至质粒等染色体外因子内,或者还可作为独立的染色体外因子包含在细胞内。出于使得目标异源多聚体蛋白质可长期表达的观点,优选表达载体整合至宿主细胞基因组内。

[0311] 从导入载体组的宿主细胞中选择产生异源多聚体蛋白质的细胞例如通过以下来实施:设定异源多聚体蛋白质的表达量和/或纯度的标准,选择达到标准的细胞;选择异源多聚体蛋白质的表达量和/或纯度相对高的细胞。具体而言,例如进行下述(a)~(d)。

[0312] (a) 向宿主细胞的培养基中添加选择药剂。

[0313] (b) 将宿主细胞单细胞化。

[0314] (c) 采集单细胞化的细胞的培养液的一部分,测定异源多聚体蛋白质的表达量和/或纯度。

[0315] (d) 选择异源多聚体蛋白质的表达量和/或纯度为标准值以上的细胞,和/或选择异源多聚体蛋白质的表达量和/或纯度相对高的细胞。

[0316] 异源多聚体蛋白质的表达量为该异源多聚体蛋白质自身的量。

[0317] 异源多聚体蛋白质的纯度意指目标异源多聚体蛋白质在多种蛋白质的总量中所占的比例。蛋白质的表达量和/或纯度可通过已知方法测定。例如,通过电泳等分离的蛋白质的量可通过荧光法、吸光度测定等已知方法检测。可使用icIEF分析装置Maurice(Protein Simple)等测定机器。在异源多聚体蛋白质的表达中,有时产生并非原本形状的多聚体蛋白质(例如缺少一部分亚基的多聚体蛋白质、某个亚基置换为其他亚基的多聚体蛋白质),期望并非原本形状的多聚体蛋白质的比例低。

[0318] 生产异源多聚体蛋白质的细胞可为瞬时表达细胞或稳定表达细胞,优选为稳定表达细胞。

[0319] 本公开的一个实施方案为生产异源多聚体蛋白质的细胞的制备中使用的载体组。载体组为第1表达载体和第2表达载体的组,这2种表达载体中包含构成异源多聚体蛋白质的亚基的全部的表达盒。由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质表达自亚基的编码序列彼此不同的n种表达盒。载体组包含亚基的编码序列彼此不同的n种表达盒。

[0320] 亚基的表达盒包含其亚基的表达所需的全部核酸。对亚基的表达盒的大小和碱基

序列没有限定。1个亚基表达盒的大小为例如400bp~4000bp(碱基对)、600bp~3000bp或800bp~2000bp。

[0321] 在载体组的构建中,构成异源多聚体蛋白质的亚基分为亚基X和亚基Y两组。

[0322] 亚基X为构成异源多聚体蛋白质的亚基的一部分,例如为想增强表达的亚基。亚基X为构成异源多聚体蛋白质的亚基的一部分而非全部。亚基X可为1种或2种以上。由n种亚基构成的异源多聚体蛋白质中亚基X的种类数为1以上且(n-1)以下的整数。

[0323] 亚基Y为从构成异源多聚体蛋白质的亚基中除去亚基X后剩余的亚基。亚基Y可为1种或2种以上。

[0324] 亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中。换言之,第1表达载体和第2表达载体两者都包含亚基X的表达盒。亚基X表达自第1表达载体和第2表达载体两者。

[0325] 例如亚基X为X1、X2和X3三种时,第1表达载体包含X1的表达盒、X2的表达盒和X3的表达盒,并且第2表达载体包含X1的表达盒、X2的表达盒和X3的表达盒。

[0326] 第1表达载体包含的至少1种亚基X的表达盒按照亚基的种类可为1个或2个以上。在亚基X为2种以上的情况下,第1表达载体包含的亚基X的表达盒的个数在亚基的种类之间可为相同的或不同的。

[0327] 例如在亚基X为X1、X2和X3三种时,第1表达载体包含的X1的表达盒的个数、X2的表达盒的个数和X3的表达盒的个数为相互独立的,可全部为相同的个数或彼此为不同的个数。

[0328] 第2表达载体包含的至少1种亚基X的表达盒按照亚基的种类可为1个或2个以上。在亚基X为2种以上的情况下,第2表达载体包含的亚基X的表达盒的个数在亚基的种类之间可为相同的或不同的。

[0329] 例如在亚基X为X1、X2和X3三种时,第2表达载体包含的X1的表达盒的个数、X2的表达盒的个数和X3的表达盒的个数为相互独立的,可全部为相同的个数或彼此为不同的个数。

[0330] 作为实施方案的一个实例,可列举以下方案:第1表达载体包含每种类1个的至少1种亚基X的表达盒,第2表达载体包含每种类1个的至少1种亚基X的表达盒。

[0331] 至少1种亚基Y的表达盒按照种类包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中。至少1种亚基Y按照种类表达自第1表达载体和第2表达载体中的一者。

[0332] 在亚基Y为2种以上的情况下,第1表达载体和第2表达载体中的一者可包含全部的亚基Y的表达盒,或者第1表达载体和第2表达载体可按照亚基种类分开地包含亚基Y的表达盒。

[0333] 例如亚基Y为Y1、Y2和Y3三种时,可为以下任一种:

[0334] 只有第1表达载体包含Y1的表达盒、Y2的表达盒和Y3的表达盒的方案;

[0335] 第1表达载体包含Y1的表达盒,第2表达载体包含Y2的表达盒和Y3的表达盒的方案;

[0336] 第1表达载体包含Y2的表达盒,第2表达载体包含Y1的表达盒和Y3的表达盒的方案;

[0337] 第1表达载体包含Y3的表达盒,第2表达载体包含Y1的表达盒和Y2的表达盒的方案。

[0338] 在第1表达载体包含亚基Y的表达盒的情况下,第1表达载体包含的至少1种亚基Y的表达盒按照亚基的种类可为1个或2个以上。在第1表达载体包含2种以上亚基Y的表达盒的情况下,第1表达载体包含的亚基Y的表达盒的个数在亚基的种类之间可为相同的或不同的。

[0339] 例如在第1表达载体包含的亚基Y为Y1、Y2和Y3三种时,第1表达载体包含的Y1的表达盒的个数、Y2的表达盒的个数和Y3的表达盒的个数为相互独立的,可全部为相同的个数或彼此为不同的个数。

[0340] 在第2表达载体包含亚基Y的表达盒的情况下,第2表达载体包含的至少1种亚基Y的表达盒按照亚基的种类可为1个或2个以上。在第2表达载体包含2种以上亚基Y的表达盒的情况下,第2表达载体包含的亚基Y的表达盒的个数在亚基的种类之间可为相同的或不同的。

[0341] 例如在第2表达载体包含的亚基Y为Y1、Y2和Y3三种时,第2表达载体包含的Y1的表达盒的个数、Y2的表达盒的个数和Y3的表达盒的个数为相互独立的,可全部为相同的个数或彼此为不同的个数。

[0342] 作为实施方案的一个实例,可列举第1表达载体和第2表达载体中的一者包含全部种类的亚基Y的表达盒各1个的方案。

[0343] 作为实施方案的另一个实例,可列举第1表达载体和第2表达载体按照种类分开地包含各种类1个的亚基Y的表达盒的方案。

[0344] 作为载体组的实施方案的一个实例,可列举至少1种亚基X的表达盒包含在第1表达载体和第2表达载体两者中,至少1种亚基Y的表达盒全部包含在第1表达载体和第2表达载体的一者中的载体组。

[0345] 换言之,上述载体组为第1表达载体和第2表达载体两者包含亚基X的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含亚基Y的表达盒。

[0346] 作为载体组的实施方案的一个实例,可列举第1表达载体包含全部种类的亚基X的表达盒各1个,第2表达载体包含全部种类的亚基X的表达盒各1个,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含全部种类的亚基Y的表达盒各1个的载体组。

[0347] 作为利用载体组的优选方案,可列举异源多聚体蛋白质为抗体的方案。作为利用载体组的更优选方案,可列举异源多聚体蛋白质为双特异性抗体的方案。

[0348] 作为利用载体组的优选方案,可列举异源多聚体蛋白质由2种以上且6种以下亚基构成,亚基X为1种、2种或3种的方案。该方案中,例如包含:

[0349] 异源多聚体蛋白质由2种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0350] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0351] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0352] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0353] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0354] 异源多聚体蛋白质由5种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0355] 异源多聚体蛋白质由6种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0356] 异源多聚体蛋白质由6种亚基构成,亚基X为3种的方案等。

[0357] 作为利用载体组的更优选方案,可列举异源多聚体蛋白质由3种、4种或5种亚基构

成,亚基X为1种或2种的方案。该方案中,例如包含:

[0358] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0359] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0360] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0361] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0362] 异源多聚体蛋白质由5种亚基构成,亚基X为1种的方案等。

[0363] 作为利用载体组的进一步优选方案,可列举异源多聚体蛋白质由3种或4种亚基构成,亚基X为1种、2种或3种的方案。该方案中,例如包含:

[0364] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为1种的方案:

[0365] 异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为2种的方案;

[0366] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为1种的方案;

[0367] 异源多聚体蛋白质由4种亚基构成,亚基X为2种的方案等。

[0368] 作为利用载体组的特别优选方案,可列举异源多聚体蛋白质由3种亚基构成,亚基X为1种或2种的方案。

[0369] 作为利用载体组的方案的一个实例,可列举异源多聚体蛋白质为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的方案。在本方案中,L链的表达量优选与第一H链和第二H链的合计表达量为同等以上。另外,在本方案中,L链的mRNA量优选与第一H链和第二H链的合计mRNA量为同等以上。mRNA量如下所述通过定量PCR求得。作为该双特异性抗体所涉及的载体组的实施方案的一个实例,可列举下述载体组。

[0370] 载体组,其中第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第二H链的表达盒。

[0371] 上述载体组的一个实例为第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒和第二H链的表达盒。

[0372] 上述载体组的另一个实例为第1表达载体和第2表达载体中的一者包含第一H链的表达盒,另一者包含第二H链的表达盒。

[0373] 为了使第一H链的表达量与第二H链的表达量为同等的,优选第1表达载体和第2表达载体中的一者以1:1的个数比包含第一H链的表达盒和第二H链的表达盒。

[0374] 出于减小表达载体大小的观点,上述双特异性抗体所涉及的载体组优选第1表达载体和第2表达载体各自包含1个L链的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第一H链的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含1个第二H链的表达盒。

[0375] 作为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体所涉及的载体组的优选方案,可列举第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒和第二H链的表达盒各1个,第2表达载体包含1个L链的表达盒的方案。

[0376] 由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体的一个实例为1个第一H链、1个第二H链和2个L链聚集而得的4聚体。

[0377] 作为利用载体组的方案的进一步的一个实例,可列举异源多聚体蛋白质为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体的方案。在本方案中,优选scFv-Fc的表达量相对于H链的表达量为0.3倍以上,更优选为0.5倍以上。另外,在本方案中,优选scFv-Fc的mRNA量为H

链的mRNA量的0.3倍以上,更优选为0.5倍以上。mRNA量如下所述通过定量PCR求得。作为该双特异性抗体所涉及的载体组的实施方案的一个实例,可列举下述载体组A和B。

[0378] 载体组A:载体组,其中第1表达载体和第2表达载体两者包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒。

[0379] 载体组B:载体组,其中第1表达载体和第2表达载体两者包含scFv-Fc的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,第1表达载体和第2表达载体中的一者包含L链的表达盒。

[0380] 上述载体组B的一个实例为第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒和L链的表达盒。

[0381] 上述载体组B的另一个实例为第1表达载体和第2表达载体中的一者包含H链的表达盒,另一种包含L链的表达盒。

[0382] 作为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体所涉及的载体组的优选方案,可列举第1表达载体包含H链的表达盒、L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒各1个,第2表达载体包含L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒各1个的方案。

[0383] 作为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体所涉及的载体组的其他优选方案,可列举第1表达载体包含H链的表达盒、L链的表达盒和scFv-Fc的表达盒各1个,第2表达载体包含1个scFv-Fc的表达盒的方案。

[0384] 由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体的一个实例为1个H链、1个L链和1个scFv-Fc聚集而得的3聚体。

[0385] 对构建表达载体的基础核酸和碱基序列没有限定。作为构建表达载体的基础核酸,例如可列举病毒载体来源的核酸、非病毒载体来源的核酸和人工核酸。基础核酸可为环状核酸或直链状核酸。

[0386] 作为病毒载体来源的核酸的实例,可列举来源于腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、痘病毒、慢病毒、疱疹病毒、杆状病毒或细菌噬菌体(bacteriophage)的核酸。

[0387] 作为非病毒载体来源的核酸的实例,可列举质粒。

[0388] 表达载体和表达盒根据宿主细胞的种类包含多肽表达所需的元件。

[0389] 在宿主细胞为原核细胞的情况下,表达载体例如可包含复制起点、限制酶位点、转录终止子和cer稳定性序列(cer stability sequence)等质粒稳定性位点(plasmid stability locus)。

[0390] 在宿主细胞为酵母的情况下,表达载体例如可包含启动子、转录终止子、选择标记和复制起点。

[0391] 在宿主细胞为昆虫细胞的情况下,表达载体例如可包含启动子、转录终止子和选择标记。

[0392] 在宿主细胞为哺乳动物细胞的情况下,表达载体例如可包含启动子、聚腺苷酸化序列(例如人类 β 球蛋白多聚A序列、牛生长激素多聚A序列、SV40早期多聚A序列(SV40 early polyA)、SV40晚期多聚A序列(SV40 late polyA))和选择标记。

[0393] 可用于原核细胞的启动子中存在J.Mol.Biol.1986;189(1):113-30中公开的启动子、噬菌体聚合酶启动子和大肠杆菌聚合酶启动子。作为具体的实例,可列举T7A1、T7A2、T7A3、 λ pL、 λ pR、lac、lacUV5、trp、tac、trc、phoA和rrnB。

[0394] 作为可用于酵母细胞的启动子的实例,可列举gal启动子、AOX1启动子、AOX2启动子、GAP启动子、GAL1启动子和GAL10启动子。

[0395] 作为可用于昆虫细胞的启动子的实例,可列举多角体蛋白 (polyhedrin) 启动子、P10启动子、病毒感染早期表达蛋白质 (IE-1) 启动子、MT启动子、COPIA启动子、CMV启动子、RSV启动子、SV40启动子、热休克蛋白质启动子、OPIE2启动子和肌动蛋白5C启动子。

[0396] 作为可用于哺乳动物细胞的启动子的实例,可列举来源于病毒的启动子和来源于管家基因的启动子。作为来源于病毒的启动子的实例,可列举人类CMV启动子、大鼠CMV启动子、SV40启动子、RSR-LTR启动子和HSK-TK启动子。作为来源于管家基因的启动子的实例,可列举hEF-1 α 启动子、中国仓鼠EF-1 α 启动子、 β 肌动蛋白启动子和小鼠磷酸甘油酸激酶 (mPGK) 启动子。可用于哺乳动物细胞的启动子的优选实例为EF-1 α 启动子,更优选为hEF-1 α 启动子。

[0397] 各亚基的表达盒中包含的启动子在其种类上可相同或不同。实施方案的一个实例为构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含同种类的启动子。实施方案的优选的一个实例为构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含hEF-1 α 启动子。

[0398] 出于促进表达的多肽向细胞外运输或分泌的目的,亚基的表达盒优选包含分泌先导物的编码序列。分泌先导物为信号肽的1种,为诱导多肽向细胞外运输或分泌的信号肽。

[0399] 在亚基的表达盒包含分泌先导物的编码序列的情况下,分泌先导物的编码序列和亚基的编码序列配置于相同阅读框中。在此,“配置于相同阅读框中”意指将两个编码序列配置为分泌先导物和亚基可作为一个多肽表达。在亚基的表达盒中,分泌先导物的编码序列和亚基的编码序列之间可具有或不具有接头或间隔子 (spacer, 间隔物) 的编码序列。

[0400] 优选方案为亚基的编码序列以相同阅读框配置于分泌先导物的编码序列下游的方案。亚基N末端侧配置分泌先导物的重组多肽从本方案的表达盒表达。更优选方案为亚基的编码序列以相同阅读框连续地配置于分泌先导物的编码序列下游的方案。亚基的N末端结合有分泌先导物的重组多肽从本方案的表达盒表达。在此,“下游”意指2个编码序列的配置顺序,在配置两个编码序列以使编码序列B在编码序列A转录后进行转录时,称为编码序列B配置于编码序列A的下游。

[0401] 重组多肽的分泌先导物一般而言在重组多肽的运输或分泌过程中从重组多肽中切断。

[0402] 作为分泌先导物的实例,可列举纤连蛋白分泌先导物、胶原蛋白分泌先导物和白蛋白分泌先导物。出于重组多肽向细胞外的分泌率高的观点,优选纤连蛋白分泌先导物。

[0403] 作为纤连蛋白分泌先导物的实例,可列举两栖类的纤连蛋白分泌先导物和哺乳动物的纤连蛋白分泌先导物。作为两栖类的纤连蛋白分泌先导物的实例,可列举非洲爪蛙的纤连蛋白分泌先导物。作为哺乳动物的纤连蛋白分泌先导物的实例,可列举人类、大鼠、小鼠、牛、猪、犬、猫和中国仓鼠的各纤连蛋白分泌先导物及其功能同等物。纤连蛋白分泌先导物的功能同等物在氨基酸序列中具有70%以上的同一性、优选75%以上的同一性、更优选80%以上的同一性、进一步优选90%以上的同一性、最优选95%以上同一性,具有将重组多肽分泌至细胞外的功能。氨基酸序列的序列同一性例如使用BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 算出。

[0404] 优选根据宿主细胞的种类来选择纤连蛋白分泌先导物的来源生物。在宿主细胞为

人类细胞的情况下,优选将人类纤连蛋白分泌先导物用于表达盒。在宿主细胞为大鼠细胞的情况下,优选将大鼠纤连蛋白分泌先导物用于表达盒。在宿主细胞为CHO细胞的情况下,优选将中国仓鼠纤连蛋白分泌先导物用于表达盒。

[0405] 作为纤连蛋白分泌先导物的实施方案的实例,可列举具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列的人类纤连蛋白分泌先导物和具有SEQ ID NO.2的氨基酸序列的中国仓鼠纤连蛋白分泌先导物。SEQ ID NO.1的编码序列的一个实例为SEQ ID NO.3。SEQ ID NO.2的编码序列的一个实例为SEQ ID NO.4。

[0406] SEQ ID NO.1:MLRGGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGA

[0407] SEQ ID NO.2:MLRGGPGLLLLAVLCLGTAVRCTEA

[0408] SEQ ID NO.3:ATGCTGAGAGGCCCTGGACCTGGACTGCTGCTGCTGGCTGTGCAGTGTCTGGGAACCGCCGTGCCTTCTACCGGCGCC

[0409] SEQ ID NO.4:ATGCTCAGGGTCCGGGACCCGGGCTGCTGCTGGCCGTCCTGTGCCTGGGGACAGCGGTGCGCTGTACCGAAGCC

[0410] 作为实施方案的一个实例,可列举构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的方案。

[0411] 在宿主细胞为人类细胞的情况下,优选构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含人类纤连蛋白分泌先导物的编码序列。

[0412] 在宿主细胞为CHO细胞的情况下,优选构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒的至少1个包含中国仓鼠纤连蛋白分泌先导物的编码序列。

[0413] 作为实施方案的一个实例,可列举构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含纤连蛋白分泌先导物的编码序列的方案。

[0414] 在宿主细胞为人类细胞的情况下,优选构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含人类纤连蛋白分泌先导物的编码序列。

[0415] 在宿主细胞为CHO细胞的情况下,优选构成异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒全部包含中国仓鼠纤连蛋白分泌先导物的编码序列。

[0416] 在实施方案的优选的一个实例中,异源多聚体蛋白质的亚基的表达盒包含相互可操作地连接的hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、亚基的编码序列和多聚A序列。

[0417] 出于确认表达载体向宿主细胞导入的目的或制备稳定表达细胞的目的,表达载体优选包含选择标记的表达盒。

[0418] 本公开中,选择标记为发挥用于选择导入了表达载体的细胞的功能的标记,意指整合至表达载体的基因和由该基因编码的蛋白质。

[0419] 选择标记的表达盒包含该选择标记的表达所需的全部核酸。对选择标记的表达盒的大小和碱基序列没有限定。

[0420] 作为选择标记的实例,可列举显示出针对选择药剂的抗性的蛋白质及其基因。作为选择药剂的实例,可列举酶抑制剂和抗生素。

[0421] 作为选择药剂为酶抑制剂的实例,存在DHFR-MTX系统。DHFR-MTX系统的选择药剂为甲氨蝶呤(MTX),选择标记为二氢叶酸还原酶(DHFR)及其基因。DHFR-MTX系统为在缺失DHFR基因的宿主细胞(例如CHO-DG44细胞)中有效的系统。

[0422] 作为选择药剂为酶抑制剂的实例,存在GS-MSX系统。GS-MSX系统的选择药剂为甲硫氨酸亚砷亚胺(MSX),选择标记为谷氨酰胺合成酶(GS)及其基因。GS-MSX系统为在缺失GS基因的宿主细胞(例如GS敲除CHO细胞)中有效的系统。

[0423] 在选择药剂为抗生素的情况下,抗生素的分解酶及作为其基因的抗生素抗性基因为选择标记。例如可列举潮霉素抗性基因、新霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、氯霉素抗性基因、四环素抗性基因、红霉素抗性基因、奇霉素(spectinomycin)抗性基因、卡那霉素抗性基因、G418抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、博来霉素(zeocin)抗性基因、腐草霉素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因。

[0424] 载体组的实施方案的一个实例为:第1表达载体包含第1选择标记的表达盒,第2表达载体包含第2选择标记的表达盒,第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记。第1选择标记为例如选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。第2选择标记为例如选自二氢叶酸还原酶基因、谷氨酰胺合成酶基因和抗生素抗性基因中的至少1种。

[0425] 载体组的实施方案的一个实例为:第1表达载体和第2表达载体中的一者包含二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因的表达盒,另一者包含抗生素抗性基因的表达盒。二氢叶酸还原酶基因的表达盒优选的一个实例包含mPGK启动子。谷氨酰胺合成酶基因的表达盒优选的一个实例包含mPGK启动子。抗生素抗性基因的表达盒优选的一个实例包含来源于病毒的启动子。

[0426] 作为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体所涉及的载体组的实施方案的一个实例,可列举下述载体组。

[0427] 载体组,其中第1表达载体包含L链的表达盒、第一H链的表达盒、第二H链的表达盒和第1选择标记的表达盒,第2表达载体包含L链的表达盒和第2选择标记的表达盒。

[0428] 出于使表达自第1表达载体的亚基量比表达自第2表达载体的亚基量多的观点,优选上述方案的载体组的第1选择标记和第2选择标记为彼此不同的种类的选择标记,第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因。更优选方案为:第1选择标记为二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因,第2选择标记为抗生素抗性基因。包含二氢叶酸还原酶基因或谷氨酰胺合成酶基因的表达载体与包含抗生素抗性基因的表达载体相比,具有在宿主细胞内拷贝数易于增加的倾向。

[0429] 作为由H链、L链和scFv-Fc构成的双特异性抗体所涉及的载体组的实施方案的一个实例,可列举下述载体组。

[0430] 载体组,其中第1表达载体包含H链的表达盒、L链的表达盒、scFv-Fc的表达盒和第1选择标记的表达盒,第2表达载体包含L链的表达盒、scFv-Fc的表达盒和第2选择标记的表达盒。

[0431] 载体组,其中第1表达载体包含H链的表达盒、L链的表达盒、scFv-Fc的表达盒和第1选择标记的表达盒,第2表达载体包含scFv-Fc的表达盒和第2选择标记的表达盒。

[0432] 载体组,其中第1表达载体包含H链的表达盒、scFv-Fc的表达盒和第1表达标记的表达盒,第2表达载体包含L链的表达盒、scFv-Fc的表达盒和第2选择标记的表达盒。

[0433] 上述方案的载体组中第1选择标记和第2选择标记的优选方案与由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体所涉及的载体组相同。

[0434] 本公开的实施方案不排除利用载体组(即第1表达载体和第2表达载体)以外的第3表达载体。第3表达载体例如可用于表达宿主细胞的生长发育或代谢所需的多肽。

[0435] 本公开的一个实施方案为用载体组转染的哺乳动物细胞。用载体组转染的哺乳动物细胞可为异源多聚体蛋白质的瞬时表达细胞或稳定表达细胞,优选为稳定表达细胞。

[0436] 本公开的一个实施方案为用载体组转染的CHO细胞。作为具体的实例,可列举用载体组转染的CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞和来源于这些细胞的株化细胞。用载体组转染的CHO细胞可为异源多聚体蛋白质的瞬时表达细胞或稳定表达细胞,优选为稳定表达细胞。

[0437] 当异源多聚体蛋白质为由第一H链、第二H链以及第一H链和第二H链共同的L链构成的双特异性抗体时,优选载体组转染的哺乳动物细胞和CHO细胞为L链的表达盒的拷贝数比第一H链的表达盒的拷贝数和第二H链的表达盒的拷贝数合计更多的细胞。由此,双特异性抗体的表达量和/或纯度提高。

[0438] 通过定量PCR(定量聚合酶链式反应,quantitative polymerase chain reaction)测定的mRNA量有助于预测细胞内存在的表达盒的拷贝数的多少。在用上述双特异性抗体所涉及的载体组转染的哺乳动物细胞和CHO细胞中,通过定量PCR测定的mRNA量优选当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.5~2,L链的mRNA量为2~10。在用上述双特异性抗体所涉及的载体组转染的哺乳动物细胞和CHO细胞中,通过定量PCR测定的mRNA量更优选当将第一H链的mRNA量设为1时,第二H链的mRNA量为0.625~1.6,L链的mRNA量为3~8。

[0439] 用载体组转染的哺乳动物细胞和CHO细胞为表达异源多聚体蛋白质的细胞,可用于异源多聚体蛋白质的制造。用载体组转染的哺乳动物细胞和CHO细胞也可施用、输注或移植至哺乳动物来利用。

[0440] 本公开的一个实施方案为异源多聚体蛋白质的制造方法。异源多聚体蛋白质的制造方法包含培养生产异源多聚体蛋白质的细胞。通过培养细胞,在细胞内生产异源多聚体蛋白质,在培养液和/或细胞中积累异源多聚体蛋白质。

[0441] 异源多聚体蛋白质的制造方法中使用的细胞为通过作为本公开的一个实施方案的细胞的制备方法制备的细胞。该细胞为依照异源多聚体蛋白质所涉及的评价标准和/或相对生产性能而选择的细胞,因此异源多聚体蛋白质的生产性优异。

[0442] 用于生产异源多聚体蛋白质的细胞的培养方法和培养基组成根据宿主细胞的种类选择即可。培养条件(例如培养规模、细胞密度、温度和CO₂浓度)也根据宿主细胞的种类选择即可。

[0443] 异源多聚体蛋白质的制造方法的实施方案的一个实例包含从培养液中回收异源多聚体蛋白质。作为从培养液中回收异源多聚体蛋白质的方法,例如可列举离心分离、过滤、透析过滤、离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法和高速液相色谱法(HPLC)。所回收的异源多聚体蛋白质例如在医药组合物的制造中使用。

[0444] 异源多聚体蛋白质的制造方法的实施方案的一个实例包含从培养基中回收积累了异源多聚体蛋白质的细胞。作为从培养基中回收细胞的方法,例如可列举离心分离和过滤。异源多聚体蛋白质依据其性质积累在细胞内部或表面。所回收的细胞例如施用、输注或移植至哺乳动物。

[0445] 本公开的一个实施方案为细胞池的制备方法。细胞池的制备方法包含将载体组导入宿主细胞中。所制备的细胞池供于生产异源多聚体蛋白质的细胞的筛选。本公开中细胞池意指各亚基的表达盒的拷贝数中具有多样性的细胞群。

[0446] 对细胞池的规模没有限制,但例如包含10种~1万种克隆。

[0447] 作为细胞池的制备方法中使用的宿主细胞,优选真核细胞,更优选哺乳动物细胞,进一步优选CHO细胞。作为CHO细胞的实例,可列举CHO-DG44细胞、CHO-K1细胞、CHO-DXB11细胞、CHOpro3⁻细胞和来源于这些细胞的株化细胞。

[0448] 细胞池中包含的细胞可为异源多聚体蛋白质的瞬时表达细胞或稳定表达细胞,优选为稳定表达细胞。

[0449] 细胞池可培养细胞来维持,也可冻结细胞来保存。

[0450] 实施例

[0451] 以下列举具体例,更具体地说明生产异源多聚体蛋白质的细胞的制备方法和载体组。以下的具体例中所示的材料、处理顺序等只要不脱离本公开的主旨,则可适当变更。本公开的载体组等的范围不应通过以下所示具体例进行限定的解释。

[0452] 需要说明的是,实施例1和实施例2中制备的双特异性抗体(BiAb1和BiAb2)的构成显示于图5。

[0453] 《实施例1》

[0454] <表达载体的构建>

[0455] 构建了表达载体1和表达载体2,用于表达由具有彼此不同的氨基酸序列的2种H链以及2种H链共同的1种L链构成的4聚体双特异性抗体。

[0456] 以下,将上述双特异性抗体称为“BiAb1”,2种H链分别称为“HC1”和“HC2”,1种L链称为“共同LC”。HC1、HC2和共同LC统称为“抗体亚基”。

[0457] 图1为表达载体1的载体图谱。表达载体1为包含1个HC1的表达盒、1个HC2的表达盒、1个共同LC的表达盒和1个DHFR基因的表达盒的载体。抗体亚基的表达盒各自包含hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、抗体亚基的编码序列和多聚A序列,抗体亚基的编码序列以相同阅读框连续地配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0458] 图2为表达载体2的载体图谱。表达载体2为包含1个共同LC的表达盒和1个潮霉素抗性基因的表达盒的载体。共同LC的表达盒包含hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、共同LC编码序列和多聚A序列,共同LC编码序列以相同阅读框连续地配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0459] <表达载体向CHO细胞导入>

[0460] 通过电穿孔法将仅表达载体1、或者表达载体1和表达载体2导入CHO-DG44细胞中。

[0461] 将导入了表达载体的CHO-DG44细胞接种至10mL OptiCHO培养基(Lifetechnologies,12681011),在温度37°C且CO₂ 5%(v/v)的气氛下静置培养。

[0462] 导入表达载体1天后,向仅导入了表达载体1的CHO-DG44细胞中添加甲氨蝶呤作为选择药剂,向导入了表达载体1和表达载体2的CHO-DG44细胞中同时添加甲氨蝶呤和潮霉素B作为选择药剂。

[0463] 导入表达载体14天后,将培养体积扩大至20mL,转移至振荡培养用125mL烧瓶,进行振荡培养。

[0464] <BiAb1生产细胞的选择>

[0465] 将经振荡培养的细胞使用液滴细胞分选仪向96孔板中每1个孔分注1个细胞,在温度37°C且CO₂ 10% (v/v)的气氛下静置培养。14天的培养后,回收培养上清,使用分子间相互作用解析装置Octet Qke (Sartorius)测定抗体浓度。选择抗体浓度高的克隆,用24孔板培养,接着用生物反应器管培养,进行扩大(scale-up,扩大规模)。这样制备了生产BiAb1的细胞。

[0466] 将通过仅导入表达载体1而制备的BiAb1生产细胞称为BiAb1-TGV细胞。将通过导入表达载体1和表达载体2而制备的BiAb1生产细胞称为BiAb1-TGV/SGV细胞。

[0467] <BiAb1的生产>

[0468] 将BiAb1-TGV细胞和BiAb1-TGV/SGV细胞分别悬浮于40mL基础培养基中,转移至振荡培养用125mL烧瓶,在温度37°C且CO₂5% (v/v)的气氛下以140rpm的速度进行振荡培养和补料(feed)。从开始培养第3天到第13天每天加入一定量的补料培养基。每隔1~3天进行取样,测定细胞密度、培养液成分和抗体浓度。开始培养第14天时回收培养液,使用深度过滤器(孔径0.22μm)去除细胞和细胞碎片,得到培养上清。

[0469] 培养上清中的抗体浓度使用蛋白A柱通过液相色谱法进行测定。使用蛋白A柱从培养上清中纯化抗体,使用icIEF分析装置Maurice (Protein Simple)进行BiAb1的定量和错配抗体(H链仅为HC1的抗体和H链仅为HC2的抗体)的定量,求得BiAb1的纯度。在此,纯度是指BiAb1/(BiAb1+错配抗体)×100(%)。表1中显示抗体浓度最高的克隆的测定结果。

[0470] 通过定量PCR测定各克隆中的抗体亚基的mRNA量。表2中显示抗体浓度最高的克隆的测定结果。表2所示的数值为将BiAb1-TGV细胞中的HC1的mRNA量设为1时的相对值。

[0471] [表1]

克隆	滴度 [g/L]	期望的 BiAb [%]	期望的 BiAb [g/L]
BiAb1-TGV	3.0	79.4	2.6
BiAb1-TGV/SGV	5.6	84.2	4.7

[0473] [表2]

克隆	HC1 表达	HC1 表达	共同 LC 表达
BiAb1-TGV	1	0.8	2.1
BiAb1-TGV/SGV	1.1	0.7	6.2

[0475] 如表1所示,两种细胞中BiAb1的纯度超过75% (4分之3)。表达载体1中包含HC1的表达盒和HC2的表达盒各1个,因此认为BiAb1-TGV细胞和BiAb1-TGV/SGV细胞以1:1的个数比拥有HC1的表达盒和HC2的表达盒。BiAb1-TGV细胞和BiAb1-TGV/SGV细胞中,HC1的表达量

和HC2的表达量为相同程度,推测难以产生错配抗体。

[0476] BiAb1量在BiAb1-TGV细胞为2.6g/L,在BiAb1-TGV/SGV细胞为4.7g/L,BiAb1-TGV/SGV细胞为BiAb1-TGV细胞的1.8倍。

[0477] 如表2所示,在BiAb1-TGV细胞中,共同LC的mRNA量为HC1的mRNA量的2.1倍,为HC2的mRNA量的2.6倍。

[0478] 表达载体1中含有HC1的表达盒、HC2的表达盒和共同LC的表达盒各1个,因此认为BiAb1-TGV细胞以1:1:1的个数比拥有HC1的表达盒、HC2的表达盒和共同LC的表达盒。亚基之间的mRNA量的差异推测是由于各自表达盒的转录效率的差异。

[0479] BiAb1-TGV/SGV细胞中,共同LC的mRNA量为HC1的mRNA量的5.6倍,为HC2的mRNA量的8.9倍。BiAb1-TGV/SGV细胞被认为拥有比HC1的表达盒和HC2的表达盒多的共同LC的表达盒。这被认为是向宿主细胞中导入了表达载体1和表达载体2两者的结果。

[0480] BiAb1-TGV/SGV细胞中,共同LC的mRNA量为HC1和HC2的合计mRNA量的3.4倍。简单预测的话,共同LC的表达量以HC1和HC2的合计表达量就足够了,因此可以说BiAb1-TGV/SGV细胞中共同LC的表达量是过剩的(为理论所需量的3倍以上)。推测共同LC的表达量过剩有助于BiAb1-TGV/SGV细胞中BiAb1量增加(为BiAb1-TGV细胞的1.8倍)。

[0481] 从用表达载体1和表达载体2的载体组转染的CHO细胞中选择BiAb1的表达量和纯度高的CHO细胞,可制备BiAb1的生产性优异的CHO细胞。

[0482] 《实施例2》

[0483] <表达载体的构建>

[0484] 构建了表达载体3和表达载体4,用于表达由1种H链、与H链配对的1种L链和1种单链抗体scFv-Fc构成的3聚体双特异性抗体。

[0485] 以下,将上述双特异性抗体称为“BiAb2”,1种H链称为“HC”,1种L链称为“LC”,1种单链抗体称为“scFv-Fc”。将HC、LC和scFv-Fc统称为“抗体亚基”。

[0486] 图3为表达载体3的载体图谱。表达载体3为包含1个HC的表达盒、1个LC的表达盒、1个scFv-Fc的表达盒和1个DHFR基因的载体。抗体亚基的表达盒各自包含hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、抗体亚基的编码序列和多聚A序列,抗体亚基的编码序列以相同阅读框连续地配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0487] 图4为表达载体4的载体图谱。表达载体4为包含1个LC的表达盒、1个scFv-Fc的表达盒和1个潮霉素抗性基因的载体。LC的表达盒包含hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、LC编码序列和多聚A序列,LC编码序列以相同阅读框连续地配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。scFv-Fc的表达盒包含hEF-1 α 启动子、纤连蛋白分泌先导物的编码序列、scFv-Fc编码序列和多聚A序列,scFv-Fc编码序列以相同阅读框连续地配置于纤连蛋白分泌先导物的编码序列的下游。

[0488] <表达载体向CHO细胞中导入>

[0489] 通过电穿孔法将仅表达载体3、或者表达载体3和表达载体4导入CHO-DG44细胞中。

[0490] 将导入了表达载体的CHO-DG44细胞接种于10mL OptiCHO培养基(Lifetechnologies,12681011)中,在温度37°C且CO₂ 5% (v/v)的气氛下静置培养。

[0491] 导入表达载体1天后,向导入了表达载体3和表达载体4的CHO-DG44细胞中同时添加甲氨蝶呤和潮霉素B作为选择药剂。

[0492] 导入表达载体14天后,将培养体积扩大为20mL,转移至振荡培养用125mL烧瓶中,进行振荡培养。

[0493] 将通过仅导入表达载体3而制备的BiAb2生产细胞称为BiAb2-TGV细胞。将通过导入表达载体3和表达载体4而制备的BiAb2生产细胞称为BiAb2-TGV/DGV细胞。

[0494] <BiAb2的生产>

[0495] BiAb2-TGV细胞和BiAb2-TGV/DGV细胞分别悬浮于40mL基础培养基中,转移至振荡培养用125mL烧瓶,在温度37℃且CO₂ 5% (v/v)的气氛下以140rpm的速度进行振荡培养和补料。从开始培养第3天到第13天每天加入一定量的补料培养基。每隔1~3天进行取样,测定细胞密度、培养液成分和抗体浓度。开始培养第14天时回收培养液,使用深度过滤器(孔径0.22μm)去除细胞和细胞碎片,得到培养上清。

[0496] 培养上清中的抗体浓度使用蛋白A柱通过液相色谱法进行测定。使用蛋白A柱从培养上清中纯化抗体,使用毛细管电泳分析装置PA800plus (AB SCIEX),进行BiAb2的定量和错配抗体(HC和scFv-Fc不配对的抗体)的定量,求得BiAb2的纯度。在此,纯度是指BiAb2/(BiAb2+错配抗体)×100(%)。表3中显示各细胞的生产性。

[0497] [表3]

	克隆	滴度 [g/L]	期望的 BiAb [%]	期望的 BiAb [g/L]
[0498]	BiAb2-TGV	2.0	51	1.0
	BiAb2-TGV/DGV	1.8	95	1.7

[0499] 各BiAb2生产细胞中抗体亚基的mRNA量通过定量PCR进行测定。表4中显示各细胞的测定结果。表4所示的数值为将BiAb2-TGV细胞中HC基因的mRNA量设为1时的相对值。

[0500] [表4]

	克隆	HC 表达	LC 表达	scFv-Fc 表达
[0501]	BiAb2-TGV	1.0	2.1	0.2
	BiAb2-TGV/DGV	0.7	2.8	0.4

[0502] 如表3所示,BiAb2-TGV细胞中BiAb2的纯度为51%,而相对地,BiAb2-TGV/DGV细胞中纯度为95%,纯度得到大幅改善。表达载体3中包含HC的表达盒和scFv-Fc的表达盒各1个,因此认为BiAb2-TGV细胞和BiAb2-TGV/DGV细胞以1:1的个数比拥有HC的表达盒和scFv-Fc的表达盒。然而,推测由于BiAb2-TGV/DGV细胞与BiAb2-TGV细胞相比纯度大幅改善,因此HC和scFv-Fc的每拷贝数的表达量不同,由此BiAb2-TGV细胞中,所生成的BiAb2的纯度降低。

[0503] BiAb2-TGV细胞中,目标BiAb的浓度为1.0g/L,而相对地,BiAb2-TGV/DGV细胞中目标BiAb的浓度为1.7g/L。

[0504] 如表4所示,BiAb2-TGV中,LC的mRNA量为HC的mRNA量的2.1倍,scFv-Fc的mRNA量为HC的mRNA量的0.2倍。

[0505] 表达载体1中含有HC的表达盒、LC的表达盒和scFv-Fc的表达盒各1个,因此认为BiAb2-TGV细胞以1:1:1的个数比拥有HC的表达盒、LC的表达盒和scFv-Fc的表达盒。亚基之

间的mRNA量的差异推测是由于各自表达盒的转录效率的差异,特别是发现了scFv-Fc与HC或LC相比转录效率显著低下。

[0506] 在BiAb2-TGV/DGV细胞中,LC的mRNA量为HC的mRNA量的4倍,scFv-Fc的mRNA量为HC的mRNA量的约0.5倍。BiAb2-TGV/DGV细胞被认为拥有比HC的表达盒多的LC和scFv-Fc的表达盒。这被认为是向宿主细胞中导入了表达载体3和表达载体4两者的结果。

[0507] 在BiAb2-TGV/DGV细胞中,尽管相对于BiAb2-TGV细胞,HC的表达量为0.7倍,但目标BiAb2的生产量变高。这被认为是由于通过scFv-Fc的表达量改善,使HC-LC同二聚体量减少,形成了正确配对的BiAb2。

[0508] 出于这些结果,通过追加导入包含转录效率相对低、表达量不足的基因的载体,可改善表达平衡,提高BiAb的生产性和纯度。

[0509] 从用表达载体3和表达载体4的载体组转染的CHO细胞中选择BiAb2的表达量和纯度高的CHO细胞,可制备BiAb2的生产性优异的CHO细胞。

[0510] 在2022年6月10日申请的日本专利申请第2022-094577号的公开,其整体通过参考并入本说明书中。本说明书中记载的全部文献、专利申请和技术规格通过参考并入本说明书中,其程度与具体且个别地记载了个别文献、专利申请和技术规格通过参考并入的情况相同。

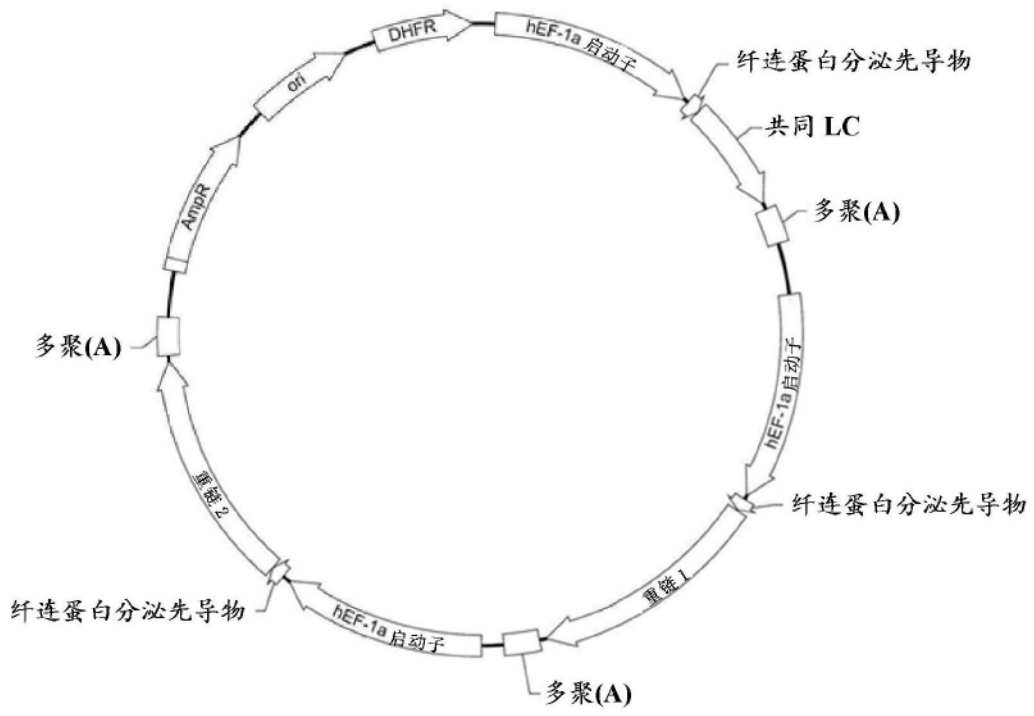


图1

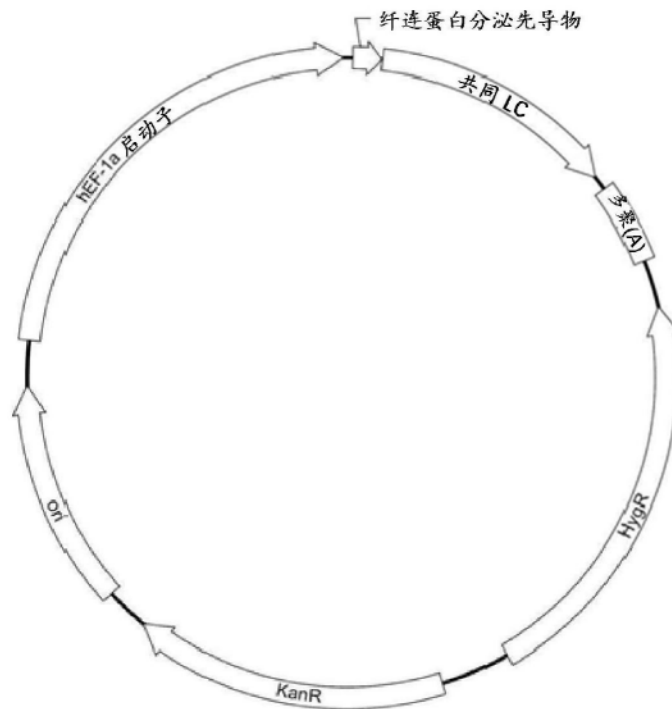


图2

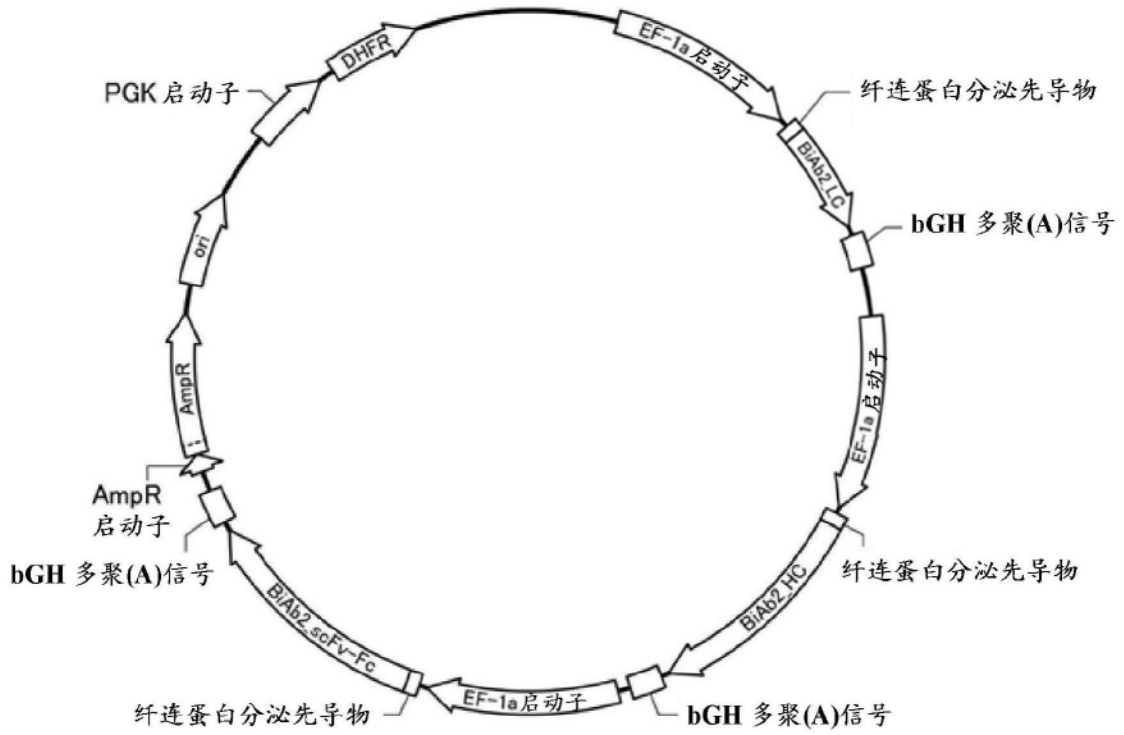


图3

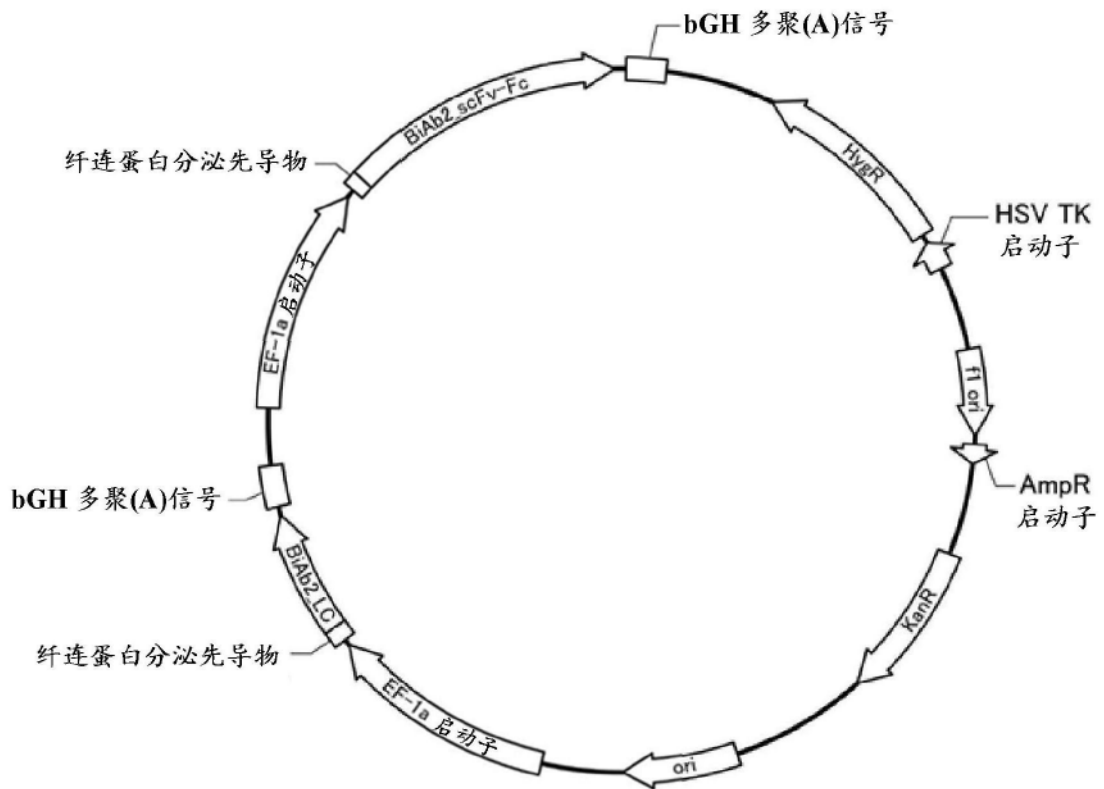


图4

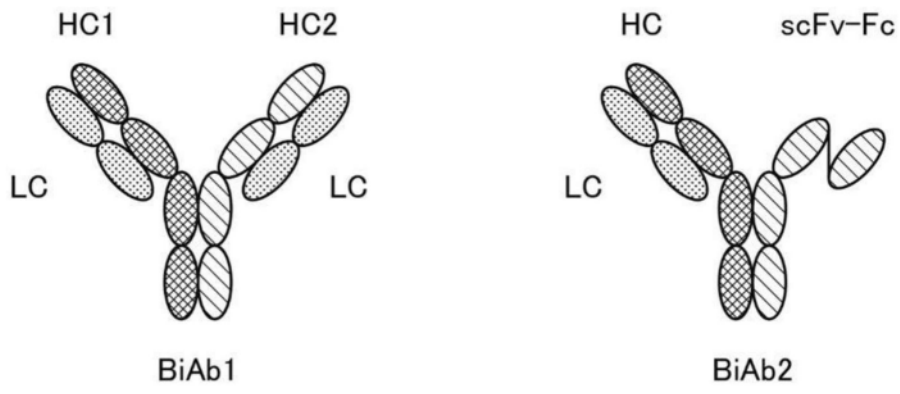


图5